

for IDS

1/1 PLUSPAT - (C) QUESTEL-ORBIT image

PN - JP2000235035 A 20000829 [JP2000235035]

TI - (A) HYBRIDIZATION DETECTING METHOD AND BIOCHIP

PA - (A) HITACHI SOFTWARE ENG

PA0 - (A) HITACHI SOFTWARE ENG CO LTD

IN - (A) YURINO YORIKO; ITO TOSHIAKI; YAMAMOTO KENJI; WATANABE
TOSHIMASA

AP - JP32835299 19991118 [***1999JP-0328352***]

PR - JP32835299 19991118 [1999JP-0328352]

- JP35595698 19981215 [1998JP-0355956]

STG - (A) Doc. Laid open to publ. Inspec.

AB - PROBLEM TO BE SOLVED: To quantatively measure how far probe DNAs
have

been hybridized with sample DNAs.

- SOLUTION: In this hybridization detecting method, the amount of probes
fixed on spots 3a, 3b, 3c of a glass plate 4 is found by causing
fluorescent materials 2 for identifying the probes 1a, 1b, 1c to emit
light, and the amount of samples hybridized with the probes is found
by causing fluorescent materials 6 for identifying samples 5a, 5b to
emit light. It is measured how far the samples have been hybridized
relative to the amount of probes spotted on a substrate with values
obtained by standardizing a difference between the two by using the
same amount of probes.

- COPYRIGHT: (C)2000,JPO

UP - 2001-05

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-235035

(P2000-235035A)

(43) 公開日 平成12年8月29日 (2000.8.29)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/50		33/53	M

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-328352

(22) 出願日 平成11年11月18日 (1999. 11. 18)

(31) 優先権主張番号 特願平10-355956

(32) 優先日 平成10年12月15日 (1998. 12. 15)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000233055

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

(72) 発明者 百合野 以子

神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

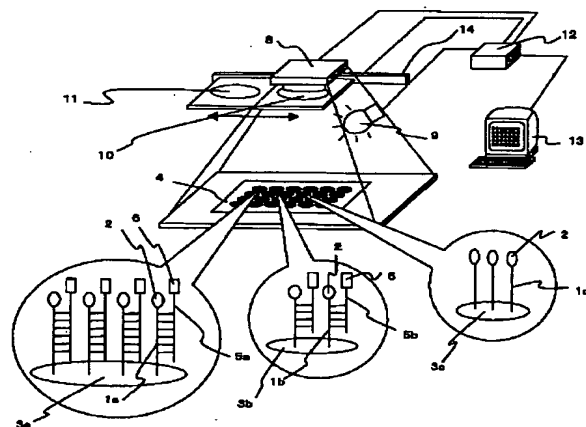
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイブリダイゼーション検出方法及びバイオチップ

(57) 【要約】

【課題】 プローブDNAとサンプルDNAがどの程度ハイブリダイズしたか、定量的な測定を可能とする。

【解決手段】 プローブ1 a, 1 b, 1 c を標識した蛍光物質2を発光させてガラスプレート4のスポット3 a, 3 b, 3 c に固定化されたプローブの量を求め、更にサンプル5 a, 5 b を標識した蛍光物質6を発光させてプローブにハイブリダイズしたサンプルの量を求める。そして、その差分を前記プローブの量で規格化した値で基板上にスポットされたプローブ量に対して、サンプルがどれくらいハイブリダイズしたかを測定する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、

プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量とを検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項2】 プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、

プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を前記プローブの量で規格化した値を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項3】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、ハイブリダイゼーションを行う前にプローブの量を検出し、ハイブリダイゼーション終了後に前記プローブに結合したサンプルの量を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項4】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、ハイブリダイゼーション終了後にプローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項5】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、プローブとサンプルに各々異なる検出用の標識が付けられていることを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項6】 請求項2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、検出されたプローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を前記プローブの量で規格化した値をディスプレイに表示することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項7】 蛍光物質で標識したプローブをスポットしたことを特徴とするバイオチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、サンプル生体高分子とプローブ生体高分子とのハイブリダイゼーションを利用してサンプル生体高分子に目的とする配列が存在するか否かを分析するハイブリダイゼーション検出法、及びそれに用いられるバイオチップに関する。

【0002】

【従来の技術】 従来から、生体内の分子を同定・分画するために、特に目的DNAの検出、あるいは遺伝子DNAの有無検出などのために、既知の配列をもつ核酸や蛋白質をプローブとしてハイブリダイズする方法が多く用いられてきた。ハイブリダイゼーション検出の方法は、固定したプローブDNAに蛍光物質を標識したサンプルDNAを入れてハイブリダイズさせる。サンプルDNAがプローブDNAに結合すると、プローブDNAと一緒に

に固定され、光源からの励起光で蛍光物質を励起し、発光する蛍光を検出することでハイブリダイゼーションを検出していた。

【0003】 図7、図8、図9は、この従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図である。図7に示すように、一定量のプローブDNA 1aをガラスプレート4にスポット3aとして固定化する。別種のプローブDNA 1b、プローブDNA 1cも同様に、スポット3b、スポット3cとして固定化する。このとき、各スポット1a、1b、1cのプローブDNAを全て同量にして固定化することはできない。

【0004】 図8(a)に示すように、全てのサンプルDNA 5a、5b、5c、…を蛍光物質6で標識する。図8(b)に示すように、プローブDNAとサンプルDNAをハイブリダイズさせるために、スポットされたガラスプレート4と蛍光標識したサンプルDNA 5a、5b、5c、…をハイブリダイゼーション溶液7に入れ、ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液7は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDNAの性質により異なる。

【0005】 このとき図8(c)に示すように、サンプルDNAとプローブDNAが相補鎖であればプローブDNA 1a、1bとサンプルDNA 5a、5bのようにハイブリダイゼーションして二重らせん構造で結合する。一方、両者が相補鎖DNAでなければ、プローブDNA 1cのようにサンプルDNAが結合しないでそのままある。ハイブリダイゼーションの検出は、図9に示すように、励起光源としてのランプ9からの励起光でガラスプレート4を照射して蛍光物質6を励起し、発光波長域以外の光を光学フィルター10でカットして、各スポットからの発光をCCDカメラなどの二次元光センサー8で検出する。

【0006】 この時、ハイブリダイゼーションが生じたスポット3a、3bには蛍光物質6が存在するため、ランプ9からの励起光によって蛍光物質6が励起され、発光が検出される。一方、ハイブリダイゼーションが生じていないスポット3cには蛍光物質6が存在しないため、ランプ9からの励起光照射によっても発光は生じない。このようにして、ハイブリダイゼーションが生じたか否かによってスポット毎に明暗が観察される。二次元光センサー8からの画像データは、コントローラ12によってコンピュータ13に転送され、ディスプレイに画像表示される。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 プローブDNAをガラスプレートに固定化するとき、全てのプローブを同じ量ずつ均等にスポットすることはできないため、プローブ

が多量に固定化されたスポットと少量に固定化されたスポットとではプローブDNAの量が異なる。このため、ハイブリダイゼーションの検出ではサンプルDNAがハイブリダイズしたか否かは判断できるが、どの位のプローブDNAにどの程度のサンプルDNAがハイブリダイズしたか定量的な測定を行うことはできなかった。本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みなされたもので、プローブDNAとサンプルDNAがどの程度ハイブリダイズしたか、定量的な測定が可能な検出方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため、本発明では、プローブ生体高分子とサンプル生体高分子に各々異なる蛍光物質を標識し、蛍光物質の発光波長が異なることを利用して各スポット毎に、そのスポットに存在しているプローブ生体高分子とサンプル生体高分子を別々に検出できるようにする。また、ハイブリダイゼーションの検出で、プローブ生体高分子を標識している蛍光物質の発光波長とサンプル生体高分子を標識している蛍光物質の発光波長を分離検出することにより、各スポット毎にプローブ生体高分子の量及びそのプローブ生体高分子にハイブリダイズしたサンプル生体高分子の量を個別に検出して定量測定することを可能とする。

【0009】すなわち、プローブ生体高分子を標識した蛍光物質を発光させてガラスプレートのスポットに固定化されたプローブ生体高分子の量を求め、更にサンプル生体高分子を標識した蛍光物質を発光させてプローブ生体高分子にハイブリダイズしたサンプル生体高分子の量を求める。そして、その差分を前記プローブの量で規格化した値で、基板上にスポットされたプローブ量に対して、サンプルがどれくらいハイブリダイズしたかを測定する。ここで生体高分子とは、DNA、RNA、蛋白質など、生体を構成する高分子をいう。

【0010】以上をまとめると、本発明によるハイブリダイゼーション検出方法は、プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量とを検出することを特徴とする。ここでいうプローブとは、基板に固定する生体高分子（例えばDNA）を示し、サンプルとはハイブリダイズに用いる生体高分子（例えばDNA）を示す。本発明によるハイブリダイゼーション検出方法は、また、プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を前記プローブの量で規格化した値を検出することを特徴とする。

【0011】プローブの量とプローブに結合したサンプルの量の検出は、ハイブリダイゼーションを行う前にプローブの量を検出し、ハイブリダイゼーション終了後にプローブに結合したサンプルの量を検出するようにして

もよいし、ハイブリダイゼーション終了後にプローブの量とプローブに結合したサンプルの量を共に検出するようにしてもよい。

【0012】プローブの量とプローブに結合したサンプルの量の検出は、プローブとサンプルに各々異なる検出用の標識を付けておき、その標識を検出することで行うことができる。検出されたプローブの量とプローブに結合したサンプルの量との差分を前記プローブの量で規格化した値はディスプレイに表示することができる。本発明によるバイオチップは、蛍光物質で標識したプローブをスポットしたことを特徴とする。

【0013】基板に固定されるプローブ量は、各プローブごと、各基板ごとに異なる。同じプローブが固定されている2個のバイオチップ1、2を用いて、異なるサンプルA、Bについて実験を行ったときを例に挙げて説明する。用いたサンプル及びプローブはDNAであるとする。バイオチップ上のあるプローブが、バイオチップ1には10ng固定され、バイオチップ2には8ng固定されていて、ハイブリダイズ前の蛍光強度が例えば256階調の100と80あったとする。サンプルA、Bをそれぞれこのバイオチップ1、2上のプローブとハイブリダイズしたとき、ハイブリダイズ後の蛍光強度がサンプルAは70、サンプルBは60となったとすると、このままではサンプルAの方がサンプルBよりもそのDNA量が多いと判断される。しかし、バイオチップにもともと固定されていたプローブの量とそのプローブに結合したサンプルの量との差分をプローブの量で規格化した値を計算して、どのくらいの割合でハイブリダイズしているのかを考えると、サンプルA： $(100-70) \div 100=0.3$ サンプルB： $(80-60) \div 80=0.25$ となり、プローブとハイブリダイズしたDNAの割合は実際にはサンプルAの方がサンプルBより少ないといえる。このようにハイブリダイズ後の蛍光強度だけでサンプルのDNA量を考えるより、より精密な解析ができる。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。ここでは、本発明の一例として、プローブ生体高分子及びサンプル生体高分子が共にDNAである場合について説明するが、DNA以外のRNAや蛋白質に対しても本発明が同様に適用可能であるのは勿論である。

【0015】図1～図3は、本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図である。図1に示すように、全てのプローブDNA1a、1b、1c、…に同一の蛍光物質2を標識する。蛍光物質2としては、例えばイソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)を使用する。プローブDNA1aをガラスプレート4にスポット3aとして固定化し、別種のプローブDNA1b、プローブDNA1c、…も同様に、スポット

3 b、スポット 3 c、…としてガラスプレート 4 に固定化する。

【0016】また、図 2 (a) に示すように、サンプル DNA は全てのサンプル DNA 5 a、5 b、5 c、…を蛍光物質 6 で標識する。蛍光物質 6 としては、例えば Cy 5 を使用する。ハイブリダイゼーションに当たっては、図 2 (b) に示すように、プローブ DNA とサンプル DNA をハイブリダイズさせるために、プローブ DNA 1 a、1 b、1 c、…がスポットされたガラスプレート 4 (図 1 参照) と蛍光標識したサンプル DNA 5 a、5 b、5 c、…とをハイブリダイゼーション溶液 7 に入れ、ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液 7 は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrate)、SDS (sodium dodecylsulfate)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用する DNA の性質により異なる。

【0017】このとき、サンプル DNA 5 a、5 b、5 c、…とプローブ DNA が相補鎖であれば、図 2 (c) に示すスポット 3 a のプローブ DNA 1 a やスポット 3 b のプローブ DNA 1 b のように、サンプル DNA 5 a、5 b、5 c、…とハイブリダイゼーションして二重らせん構造で結合する。一方、両者が相補鎖 DNA でなければ、図 2 (c) に示すスポット 3 c のプローブ DNA 1 c のように、サンプル DNA が結合しないでそのままである。つまり、ハイブリダイゼーションが生じたスポット 3 a や 3 b には、プローブ DNA 1 a、1 b を標識している蛍光物質 2 と、プローブ DNA 1 a、1 b に結合したサンプル DNA 5 a、5 b を標識している蛍光物質 6 が存在する。一方、ハイブリダイゼーションが生じていないスポット 3 c には、プローブ DNA 1 c を標識している蛍光物質 2 のみが存在する。

【0018】ハイブリダイゼーションの検出は、図 3 に示すように、励起光源としてのランプ 9 からの励起光でサンプルを標識する蛍光物質 6 とプローブ DNA を蛍光物質 2 を励起して発光させる。励起光源のランプとしては例えば、発光波長域が約 300-約 700 nm であるキセノンランプを使用する。これは、FITC が励起波長 490 nm、発光波長 520 nm であり、Cy 5 が励起波長 650 nm、発光波長 667 nm であるため、両方の蛍光物質を同時に発光させることができるからである。発光の検出にあたっては、FITC の発光を読み取るときは透過波長 520 nm の光学フィルター 10 を、Cy 5 の発光を読み取るときは透過波長 667 nm の光学フィルター 11 を用いて二次元光センサー 8 で読み取る。二次元光センサー 8 からのデータは、コントローラ 12 によってコンピュータ 13 に転送される。二次元光センサー 8 としては例えば CCD カメラを使用し、2 枚の光学フィルター 10、11 はステージ 14 の駆動によって矢印の方向に移動され、交換される。

【0019】コンピュータ 13 では、FITC の発光を読み取ったデータ値から各スポットにおけるプローブ DNA の量を求め、Cy 5 の発光を読み取ったデータ値から各スポットにおいてプローブ DNA とハイブリダイズしたサンプル DNA の量を求める。FITC の発光量 A_i から Cy 5 の発光量 B_i を引いて得られた差分を FITC の発光量で割った評価値 C_i [$C_i = (A_i - B_i) / A_i$] を計算すれば、プローブ DNA 量からの相対値でハイブリダイズしたサンプル DNA 量を求めることができ、高精度な定量測定ができる。

【0020】上記評価値 C_i を計算することにより、評価値 C_i [$C_i = (A_i - B_i) / A_i$] が大きいほどプローブ DNA にハイブリダイズしたサンプル DNA の量が少ないことを意味し、反対に評価値 C_i が小さいほどプローブ DNA にハイブリダイズしたサンプル DNA の量が多い、即ちプローブ DNA と相補性があると判断できる。ここで、評価値として $C_i = (A_i - B_i) / A_i$ を採用したのは、プローブ DNA 量からハイブリダイズしたサンプル DNA 量を引いた方が比較を簡単に行えるからである。つまり、どんな状態でも、基板上に固定されたプローブ DNA の方が、その DNA にハイブリダイズしたサンプル DNA の量より少ないということはないからである。

【0021】図 4 は、評価値の処理手順を示すフローチャートである。ステップ 11 において、評価値を計算するスポットの番号を初期設定する。ステップ 12 では、スポット i の FITC の発光量 A_i と Cy 5 の発光量 B_i を求める。ステップ 13 では、発光量の差分を発光量 A_i で割った値 $C_i = (A_i - B_i) / A_i$ を計算する。得られた評価値 C_i はハイブリダイズしなかったプローブ DNA 量に対応し、これからサンプル DNA とプローブ DNA との相補性の程度を判断することができる。ステップ 14 では、求めた相対値 C_i をコンピュータ 13 の表示部に階調として表示する。このとき、評価値の大きい値は明るく、小さい値は暗く表示する。また、ポジフィルムのようにその反対で表示してもよい。ステップ 15 では、全てのスポットを処理したかチェックし、全てのスポットの処理が終了していないときはステップ 16 で次のスポットの位置を求め、ステップ 12 からの処理を繰り返す。全てのスポットの計算が終了したときは処理を終了する。

【0022】図 5 及び図 6 は、本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図である。この検出方法は、ハイブリダイゼーションする前にプローブ DNA の量、すなわちプローブ DNA に標識した FITC 等の発光量を読み取っておき、ハイブリダイゼーション後、サンプル DNA の量、すなわちサンプル DNA に標識した Cy 5 等の発光量を読み取り、評価値を求める方法である。

【0023】図 5 (a) に示すように、例えば FITC のような蛍光物質で標識したプローブ DNA をスポット

3 a, 3 b, 3 c, …としてガラスプレート4に固定化する。これは、先に図1にて説明したのと同様の方法で行う。次に、ハイブリダイゼーション前に各スポット3 a, 3 b, 3 c, …のプロープDNAの量を読み取るため、図5 (b) に示すように、ランプ9からの励起光を照射してプロープDNAに標識したF I T Cの発光量を二次元光センサー8で読み取る。このとき、二次元光センサー8の光路中には透過波長520 nmの光学フィルター10を配置する。これは、先に図3によって説明したF I T Cの発光量読み取りと同様にして行われる。読み取った各スポットの発光量データA iは、フロッピーディスク14などの記憶媒体に格納しておく。

【0024】例えばCy5からなる蛍光物質6で標識したサンプルDNA 5 a, 5 b, 5 c, …とプロープDNAとのハイブリダイゼーションは、図6 (a) に示すように、図2 (b) で説明したのと同様にして行われる。ハイブリダイゼーションの検出は、図6 (b) に示すように、ランプ9からの励起光でガラスプレート4を照射し、Cy5からの発光量を二次元光センサー8で読み取ることによって行われる。このとき、二次元光センサー8の光路中には透過波長667 nmの光学フィルター11を配置する。これは、図3で説明したCy5の発光読み取りと同様である。このあと、フロッピーディスク14に格納されているF I T Cの発光量データA iを読み込み、Cy5の発光量データB iとの差分をとる。各差分はF I T Cの発光量データA iで割る。差分の取り方は、図3に示す処理と同様であり、この方法によっても定量測定ができる。

【0025】この方法は、基板にどの程度プロープDNAが固定化されたか、ハイブリダイゼーションを行う前に分かるため、サンプルDNAの量をどの程度にしてハイブリダイゼーションすればよいか、また、プロープDNAが固定化できなかった無効なスポットの位置などをハイブリダイゼーション前に知ることができるため、事

前の対処ができ、効率の良い実験ができる。

【0026】

【発明の効果】本発明によると、スポットされたプロープの量と、プロープにハイブリダイゼーションしたサンプルの量を知ることができ、その差分を前記プロープの量で規格化した値を求めることでより厳密なハイブリダイズ量（相補性の程度）を計算でき、プロープに結合したサンプルの量を高精度に測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

【図2】本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

【図3】本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

【図4】評価値の処理手順を示すフローチャート。

【図5】本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図。

【図6】本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図。

【図7】従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

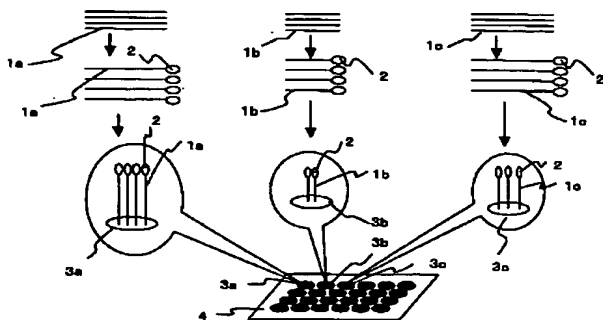
【図8】従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

【図9】従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

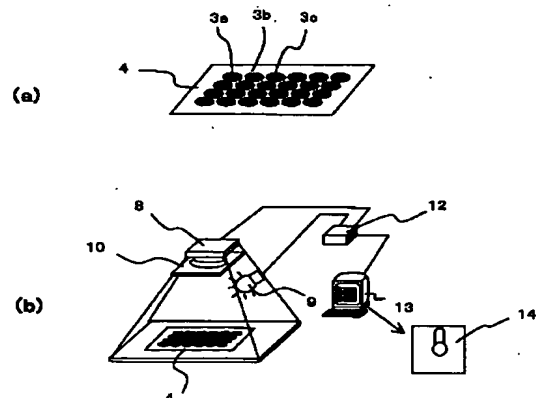
【符号の説明】

1 a, 1 b, 1 c…プロープDNA、2…蛍光物質、3 a, 3 b, 3 c…プロープDNAのスポット、4…ガラスプレート、5 a, 5 b, 5 c…サンプルDNA、6…蛍光物質、7…ハイブリダイゼーション溶液、8…二次元光センサー、9…励起光源、10, 11…光学フィルター、12…コンピュータ、13…コントローラ、14…フロッピーディスク

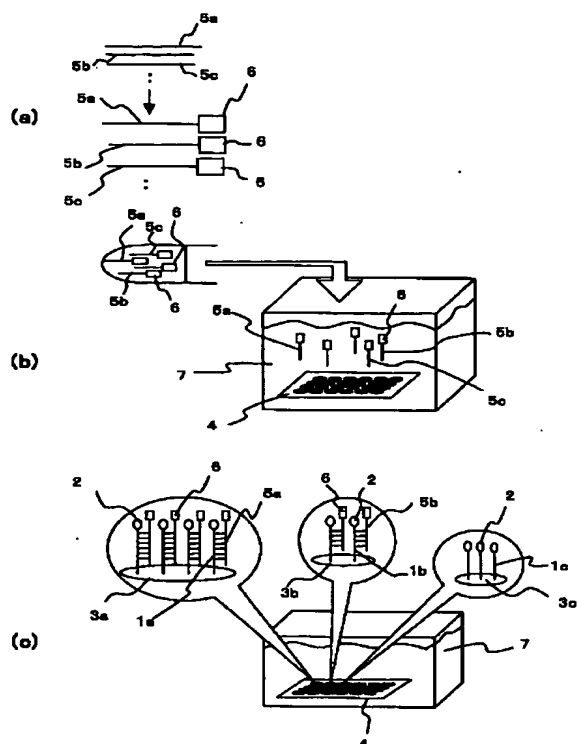
【図1】



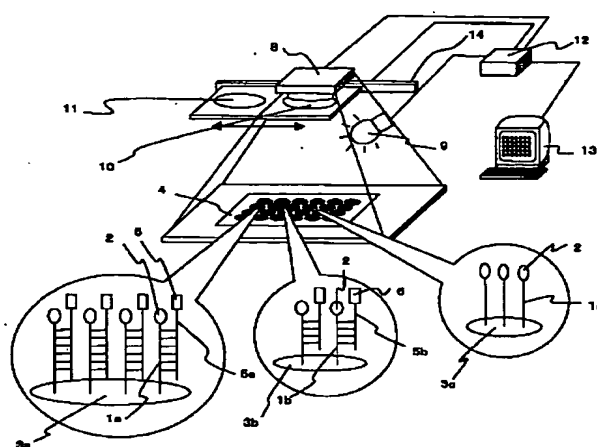
【図5】



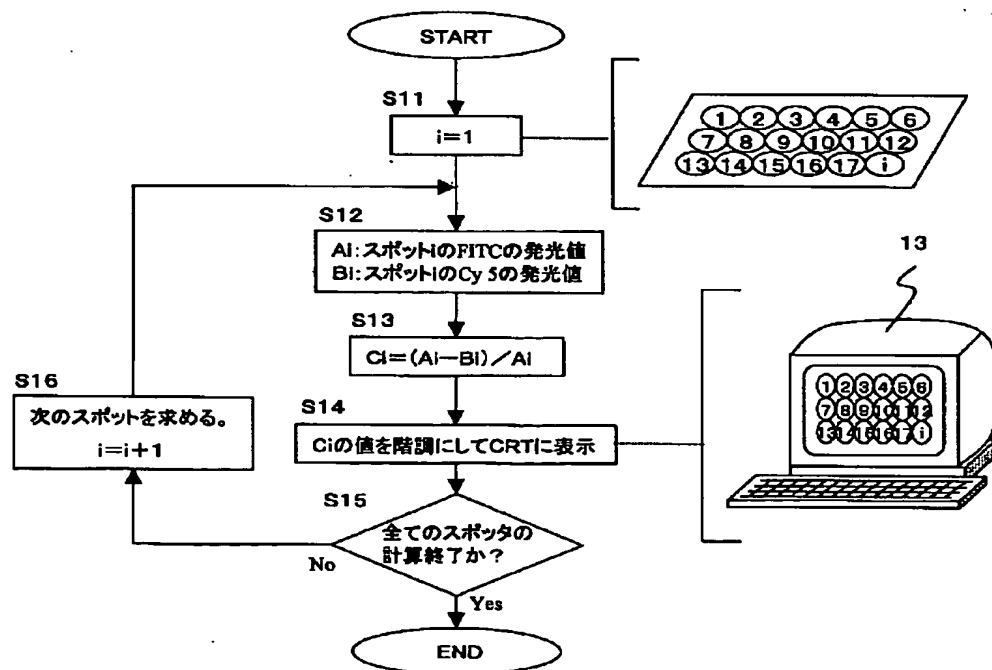
【図 2】



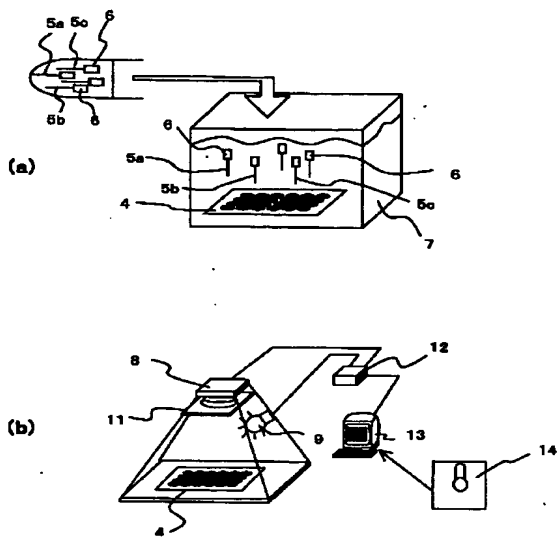
【図 3】



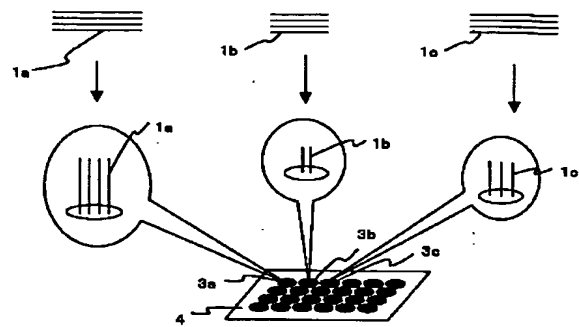
【図 4】



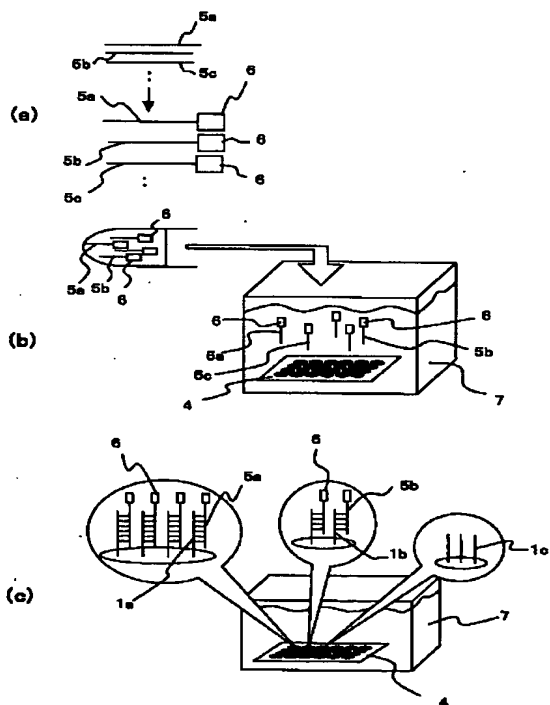
【図6】



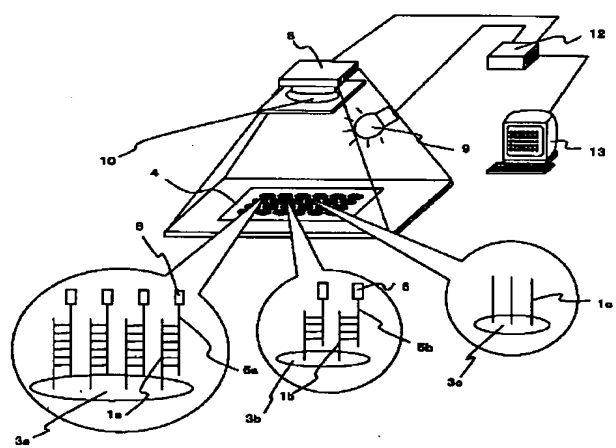
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 15/00	A

(72) 発明者 山本 顕次
神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 81 番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

(72) 発明者 伊藤 敏明
神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 81 番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内

10 (72) 発明者 渡辺 敏正
神奈川県横浜市中区尾上町 6 丁目 81 番地
日立ソフトウェアエンジニアリング株式会
社内